

Platelet procoagulant activity: focus on calcium entry and phospholipid scrambling

Citation for published version (APA):

van Kruchten, R. (2014). *Platelet procoagulant activity: focus on calcium entry and phospholipid scrambling*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress.
<https://doi.org/10.26481/dis.20140117rk>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

DOI:

[10.26481/dis.20140117rk](https://doi.org/10.26481/dis.20140117rk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Platelets have prominent roles in thrombus formation. This involves their adherence to extracellular matrix components, co-aggregation to form a platelet plug, and stimulation of the coagulation process. Elevation of the intracellular Ca^{2+} level is an essential signalling event in the process of platelet activation and, hence, for thrombus formation. Store-operated Ca^{2+} entry is considered to be the most important Ca^{2+} entry route in activated platelets. Prolonged high intracellular calcium levels activate the scrambling of membrane phospholipids, resulting in exposure of phosphatidylserine (PS) at the outer leaflet of the plasma membrane. The exposure of PS stimulates coagulation by providing a catalytic surface for the assembly of coagulation factor complexes and ensuing thrombin generation.

In chapter 1, relevant background information is given on the roles of platelets in thrombosis. The role of fluid dynamics in the process of thrombus formation is discussed, as well as the use of parallel-plate flow chambers to determine whole blood thrombus formation. Furthermore, an introduction is given into the mechanisms of platelet Ca^{2+} signalling, with special attention to the functions of STIM1 and Orai1, two proteins involved in platelet store-operated Ca^{2+} entry. Current knowledge on the mechanisms of phospholipid scrambling is discussed, with a focus on TMEM16F (also called anoctamin 6), a protein proposed to be involved in Ca^{2+} -induced phospholipid scrambling. Apart from platelet activation, also platelet apoptosis is mentioned as another route by which platelets can expose PS.

In chapter 2 practical issues are discussed regarding the use of parallel-plate flow chambers for the assessment of *in vitro* whole-blood thrombus formation. The aim of this chapter is to provide new guidelines for a reproducible assessment of *in vitro* thrombus formation. The practical issues discussed encompass, among others, flow chamber assembly, calculation of shear rates, common experimental artefacts, and abilities of microscopic image recording. Because residual coagulation can strongly influence the outcome of the process of *in vitro* thrombus formation, methods are described to restrict coagulation or to allow coagulation in a controlled manner. Furthermore, a wide variety of possible substrates and possible read-out parameters are given. Although a clear role for Orai1 and STIM1 in regulating platelet store-operated Ca^{2+} and thrombus formation has been demonstrated, their relative contribution to platelet procoagulant activity and thrombus formation under coagulating and non-coagulating conditions remains obscure. This issue is addressed in chapter 3. *In vitro* experiments, using blood from mice with platelet deficiencies in STIM1 or Orai1, showed that collagen-driven thrombus formation, platelet Ca^{2+} signaling, and platelet PS exposure are significantly impaired in absence of STIM1 or Orai1. Notably, these effects tended to normalize upon introduction of coagulation. Additional experiments in washed platelets confirmed that STIM1 and Orai1 became redundant in the concomitant presence of high thrombin concentrations. Also evidence for an Orai1-independent Ca^{2+} entry pathway in platelets is presented. This alternative pathway appeared to become prominent upon combined collagen/thrombin stimulation. In contrast to STIM1, deficiency in STIM2 did not show any effect on thrombus formation or platelet procoagulant activity, indicating that STIM2 does not play a major role in platelet activation.

Given the importance of Ca^{2+} entry for platelet activation and thrombus formation, potential inhibitors of Orai1 were tested for their efficacy to suppress these processes, the

results of which are described in chapter 4. Apart from the known platelet Ca^{2+} entry inhibitors 2-APB and SKF96365, the novel compounds Synta66 and GSK-7975A were identified as effective inhibitors of platelet store-operated Ca^{2+} . Subsequent experiments, measuring whole blood thrombus formation in parallel-plate flow chambers, revealed that the compounds 2-APB, Synta66 and GSK-7975A all were able to suppress platelet procoagulant activity, Ca^{2+} responses, and thrombus formation under flow. In addition, 2APB markedly reduced the size of brain infarctions in an *in vivo* murine stroke model. Experiments performed with Orai1-deficient blood pointed to Orai1 as primary target of these compounds. Altogether, the data from chapter 3 and 4 identify Orai1 as a potential target for development of novel anti-thrombotic agents.

As described, elevation of intracellular Ca^{2+} stimulates phospholipid scrambling in platelets. Scott syndrome is a rare bleeding disorder in which Ca^{2+} -dependent phospholipid scrambling in platelets and other blood cells is impaired. Recently, this defect could be attributed to the absence of functional TMEM16F. In chapter 5, the involvement of TMEM16F in various pathways to platelet PS exposure was studied by *in vitro* experiments, using platelets from a patient with Scott syndrome. Phospholipid scrambling upon platelet apoptosis was determined by incubation of platelets with the BH3-mimetic ABT-737. While platelets from Scott syndrome patients and healthy controls showed a similar percentage of PS exposure upon ABT-737-induced apoptosis, the Scott platelets failed to generate a specific, high PS-exposing population. This led to the conclusion that, although TMEM16F is not critically involved in PS exposure upon apoptosis, it does accelerate PS exposure in a subset of the apoptotic platelets. Additional experiments with the intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA confirmed that the TMEM16F-mediated phospholipid scrambling is Ca^{2+} dependent. Regarding phospholipid scrambling, a major finding was that upon co-stimulation of platelets with collagen and thrombin, next to a TMEM16F-dependent pathway, also a TMEM16F-independent pathway to PS exposure is activated. The insensitivity of the latter pathway to pharmacological inhibition by either the caspase inhibitor Q-VD-Oph or the mitochondrial inhibitor cyclosporin A, suggested that it acts independently of caspase activity and Cyclophilin D-dependent mitochondrial depolarization.

In chapter 6, the role of TMEM16F in phospholipid scrambling upon platelet activation and platelet apoptosis was confirmed using murine TMEM16F knockout platelets. Furthermore, the consequences of TMEM16F heterozygosity were tested. Platelet PS exposure was not affected in heterozygous TMEM16F-deficient platelets. However, Ca^{2+} ionomycin-induced PS exposure was affected in heterozygous erythrocytes. These erythrocytes showed levels of PS exposure that were intermediate between those in wild type and homozygous TMEM16F-deficient erythrocytes. This suggests that TMEM16F expression is a limiting factor in Ca^{2+} -induced phospholipid scrambling in mouse erythrocytes.

Recent reports indicate that TMEM16F is a calcium-activated channel that is involved in conducting anion (chloride) and cation (calcium) currents. In chapter 7, these properties were studied using immortalized B-cells from two unrelated Scott syndrome patients and healthy controls. Calcium elevation was able to stimulate large whole cell currents in control lymphocytes, but not in Scott lymphocytes, although a small residual chloride current could be identified in the B-cells from one patient. Whole cell currents were also suppressed upon knockdown of TMEM16F by siRNA, by replacement of chloride by gluconate,

and by pharmacologic chloride channel blockade. The process of Ca^{2+} -induced PS exposure was strongly impaired in both Scott lymphocytes cell lines, while PS exposure was not impaired in these cells in response to apoptotic stimuli, which is in line with the defect found in platelets. The Ca^{2+} -induced PS exposure in control lymphocytes could not be inhibited by suppression of chloride currents, by pharmacological blockade or chloride replacement, suggesting that Ca^{2+} -activated phospholipid scrambling does not rely on chloride currents.

In chapter 8, the most important findings of this thesis are discussed in view of the current literature.

Samenvatting

Bloedplaatjes hebben een veelzijdige rol in de vorming van een trombus. Dit behelst het aanhechten van plaatjes aan extracellulaire matrixcomponenten, het samenklonteren van plaatjes tot een plaatjesplug en het stimuleren van de bloedstolling. Stijging van het intracellulaire calciumniveau is een essentiële signaleringsstap in het proces van plaatjesactivatie en daarmee ook voor trombusvorming. De voornaamste route voor calciuminstroom in plaatjes verloopt via het mechanisme van store-operated calciuminflux. In sterk geactiveerde plaatjes wordt, door de langdurig hoge intracellulaire calciumniveaus, het proces van fosfolipiden-scrambling geactiveerd. Dit heeft de expositie van fosfatidylserine op de buitenzijde van het plaatjesmembraan als gevolg. De expositie van fosfatidylserine stimuleert vervolgens de stolling omdat het een katalytisch oppervlak vormt waarop stollingsfactoren kunnen complexeren en activeren.

In hoofdstuk 1 wordt relevante achtergrondinformatie gegeven over de veelzijdige rol van plaatjes in trombose. De rol van de stromingscondities in het proces van trombusvorming wordt besproken, evenals het gebruik van parallelplaat-flowkamers voor de bepaling van trombusvorming in volbloed. Verder worden de mechanismen beschreven van calciumsignalerings in plaatjes, met de nadruk op de functies van STIM1 en Orai1, twee eiwitten betrokken bij de store-operated calciuminstroom. Tevens wordt de huidige kennis over het mechanisme van fosfolipiden-scrambling geïnventariseerd, met focus op TMEM16F, een eiwit dat bepalend is voor calcium-gereguleerde fosfolipiden-scrambling. Niet alleen plaatjesactivatie, maar ook plaatjesapoptose komt aan bod, omdat dit laatste proces een andere manier is via welke plaatjes fosfatidylserine kunnen exposeren.

In hoofdstuk 2 wordt praktische informatie gegeven over het gebruik van parallelplaat-flowkamers voor de bepaling van trombusvorming in geïsoleerd volbloed. Het doel van dit hoofdstuk is verbeterde voorschriften aan te dragen voor het reproduceerbaar meten van *in vitro* trombusvorming. Onderwerpen die in dit hoofdstuk aan bod komen omvatten onder andere de constructie van de flowkamer, het berekenen van afschuifsnellheden, experimentele artefacten en de wijze van opname van (fluorescentie)beelden. Omdat zelfs minieme trombinevorming en stolling het proces van trombusvorming sterk kan beïnvloeden, wordt uitgebreid ingegaan op methodes om ofwel de stolling te voorkomen, ofwel op een gecontroleerde manier te laten plaatsvinden. Verder bevat hoofdstuk 2 een uiteenzetting van de potentiële substraten waarop trombusvorming kan plaatsvinden, alsook van de diverse mogelijke uitkomstparameters.

Alhoewel al eerder is aangetoond dat de eiwitten STIM1 en Orai1 een voorname rol spelen bij de regulatie van store-operated calciuminstroom en trombusvorming, is hun betrokkenheid bij de procoagulante respons van plaatjes en trombusvorming onder stollende en niet-stollende condities nooit bepaald. Dit is onderzocht in hoofdstuk 3. Uit *in vitro* experimenten met bloed van muizen met STIM1- of Orai1-deficiënte plaatjes bleek, dat collageen-afhankelijke trombusvorming, calciumsignalerings en fosfatidylserine expositie significant onderdrukt zijn in afwezigheid van STIM1 of Orai1. Een opvallende bevinding was dat deze effecten geringer werden onder stollingscondities, dat wil zeggen met trombine. Vervolgexperimenten met gewassen plaatjes bevestigden dat STIM1 en Orai1 niet meer bepalend zijn voor collageen-geïnduceerde plaatjesactivatie in de aanwezigheid van trombine. Tevens werden aanwijzingen gevonden voor een Orai1-onafhankelijke route van calciuminstroom. Deze alternatieve route bleek vooral prominent na gecombineerde

stimulatie van plaatjes met collageen en trombine. In tegenstelling tot de effecten van deficiëntie van STIM1, bleek STIM2-deficiëntie niet van invloed op trombusvorming of procoagulante activiteit van plaatjes. Dit impliceert dat STIM2 geen belangrijke rol speelt in de calciumsignalerings van plaatjes.

Gezien het belang van calciuminstroom voor plaatjesfunctie en trombusvorming, althans onder condities waar de stolling beperkt is, werden in hoofdstuk 4 potentiële remmers van Orai1 getest. Naast de bekende calciumremmers 2-APB en SKF-96365, werden de verbindingen Synta66 en GSK-7975A geïdentificeerd als effectieve remmers van store-operated calciuminstroom in plaatjes. Vervolgmetingen van *in vitro* trombusvorming in parallelplaat-flowkamers, maakten duidelijk dat 2-APB, Synta66 en GSK-7975A in staat zijn om zowel de procoagulante activiteit van plaatjes en de calciumrespons, alsook trombusvorming te onderdrukken onder stromingscondities. Tevens bleek, middels een *in vivo* muismodel van ischemisch herseninfarct, dat remming van Orai1 door 2APB leidt tot een aanzienlijke verkleining van het infarctgebied na vasculaire occlusie. Experimenten met Orai1-deficiënt bloed gaven aan dat plaatjes-Orai1 het primaire doeleiwit is van 2APB. Samenvattend, laten de data van hoofdstuk 3 en 4 zien dat Orai1 een potentieel target is voor de ontwikkeling van nieuwe antitrombotische medicatie.

Zoals beschreven, stimuleert stijging van de intracellulaire calciumconcentratie het proces van fosfolipiden-scrumbling in plaatjes. Het Scott syndroom is een zeer zeldzame bloedingsaandoening, waarbij plaatjes en andere bloedcellen niet in staat zijn tot calciumgeïnduceerde fosfolipiden-scrumbling. Onlangs bleek dat de oorzaak van dit defect gelegen is in de afwezigheid of dysfunctie van het TMEM16F-eiwit, ook wel aangeduid als anoctamin 6. In hoofdstuk 5 is de betrokkenheid van TMEM16F onderzocht in de verschillende signaleringsroutes leidend tot fosfatidylserine-expositie in plaatjes. Dit werd gedaan door *in vitro* experimenten, gebruikmakend van de plaatjes van een patiënt met het Scott syndroom. Fosfolipiden-scrumbling als gevolg van apoptose werd bestudeerd door plaatjes te incuberen met de verbinding ABT-737, die in gezonde cellen apoptose veroorzaakt. Alhoewel het proces van fosfatidylserine-expositie onder invloed van ABT-737 in de Scott-plaatjes als zodanig optrad, bleek een plaatjespopulatie met hoge fosfatidylserine-expositie afwezig te zijn. Hieruit werd geconcludeerd dat TMEM16F weliswaar niet essentieel is voor fosfatidylserine-expositie als gevolg van apoptose, maar dat het betrokken is bij de acceleratie van dit proces in een populatie van apoptotische plaatjes. Vervolgexperimenten met de intracellulaire calcium-chelator BAPTA bevestigden de veronderstelde calciumafhankelijkheid van de TMEM16F-gemedieerde fosfolipiden-scrumbling. Bij stimulatie met collageen en trombine bleek, dat er zowel een TMEM16F-afhankelijke als een TMEM16F-onafhankelijke signaleringsroute geactiveerd werd, beide leidend tot fosfolipiden-scrumbling. Uit het feit dat de TMEM16F-onafhankelijke route ongevoelig was voor de caspase-remmer Q-VD-Oph en de mitochondriële remmer cyclosporine A, werd geconcludeerd dat deze route onafhankelijk verloopt van caspase-activiteit en cyclofiline D-gemedieerde depolarisatie van het mitochondriële membraan.

In hoofdstuk 6 werd met behulp van TMEM16F-deficiënte muizenplaatjes de rol van TMEM16F bestudeerd in fosfolipiden-scrumbling als gevolg van plaatjesactivatie en apoptose. Uit experimenten met heterozygote TMEM16F-deficiënte muizenplaatjes bleek dat de fosfatidylserine-expositie hier niet verstoord is. Daarentegen was er wel een ver-

minderde fosfatidylserine-expositie als gevolg van calciumverhoging in heterozygote TMEM16F-deficiënte rode bloedcellen. Deze rode cellen vertoonden intermediaire niveaus van fosfatidylserine-expositie, in vergelijking met wildtype of volledig TMEM16F-deficiënte cellen. Deze resultaten suggereren dat TMEM16F-expressie een limiterende factor is voor calcium-geïnduceerde fosfolipiden-scrambling in muizenerytrocyten.

Behalve betrokkenheid van TMEM16F bij fosfolipiden-scrambling, is in de literatuur ook een rol van TMEM16F beschreven als eiwitkanaal voor anionen (Cl^-) en kationen (Ca^{2+}). In hoofdstuk 7 werden deze eigenschappen van TMEM16F bestudeerd met behulp van geïmmortaliseerde B-cellen, afkomstig van twee verschillende patiënten met Scott syndroom en van gezonde proefpersonen. Met de patch-clamp techniek werd een calcium-afhankelijke chloridestroom gemeten in de controle lymfocyten, maar niet in de Scott lymfocyten. Zowel uitschakeling van TMEM16F middels siRNA, vervanging van chloride-ionen door andere anionen, als farmacologische blokkade van de chloride-instroom, onderdrukte deze ionenstromen. De calcium-afhankelijke fosfatidylserine-expositie was sterk verminderd in de cellijnen van beide Scott patiënten, terwijl de fosfatidylserine-expositie als gevolg van apoptose normaal verliep in deze cellen, zulks in overeenstemming met de observaties aan Scott plaatjes. Calciumafhankelijke fosfatidylserine-expositie in controle lymfocyten werd niet geremd door onderdrukking van chloridestromen middels ofwel farmacologische blokkade, ofwel vervanging van chloride-ionen door andere anionen. Dit suggereert dat calcium-geïnduceerde fosfolipiden-scrambling als zodanig niet afhankelijk is van de chloridestromen. Ten slotte zijn in hoofdstuk 8 de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift besproken in het licht van de huidige literatuur.